

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 3900272 A1

⑯ Aktenzeichen: P 39 00 272.1

⑯ Anmeldetag: 7. 1. 89

⑯ Offenlegungstag: 12. 7. 90

⑯ Int. Cl. 5:

B 01 D 15/04

B 01 J 20/30

C 08 J 5/20

C 08 J 3/24

C 08 L 75/04

C 08 L 63/00

G 01 N 30/48

G 01 N 30/98

DE 3900272 A1

70

⑯ Anmelder:

Müller-Schulte, Detlef, Dr., 5100 Aachen, DE

⑯ Vertreter:

Klöpsch, G., Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anw., 5000 Köln

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Synthetisches polymeres Trägermaterial für chromatographische Trennverfahren, Verfahren zu seiner Herstellung und Verwendung

Ein synthetisches polymeres Trägermaterial für chromatographische Zwecke wird aus einem OH-Gruppen enthaltenden Polymeren und einem Vernetzer in heterogener Phase oder durch Plasmabeschichtung eines kugel- oder perlörmigen Matrixkörpers mit einem geeigneten Gruppen aufweisenden Monomeren und Derivatisierung des Produktes zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen erhalten.

DE 3900272 A1

Source: C.S. # 507B

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein synthetisches polymeres Trägermaterial für chromatographische Trennverfahren, welches erhältlich ist durch Umsetzung eines OH-Gruppen enthaltenden Polymeren mit einem bi- oder trifunktionellen Vernetzer in heterogener Phase in einem Lösungsmittel, welches den Vernetzer gut, den Polymerträger jedoch kaum löst oder quellt, und anschließende Derivatisierung des erhaltenen Produkts zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen, oder durch Plasmabeschichtung eines kugel- oder perlähnlichen, mechanisch stabilen Matrixkörpers mit mindestens einem, eine oder mehrere Epoxy-, Isocyanat-, Hydroxygruppen oder zu Hydroxygruppen verseifbare Gruppen tragenden, verdampfbaren monomeren Grundkörper und Derivatisierung des erhaltenen Produkts zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen.

Für den Einsatz zu chromatographischen Zwecken werden nach dem Stand der Technik drei unterschiedliche Gruppen von Trägermaterialien eingesetzt:

- a) Träger auf anorganischer Basis wie Silikate, Gläser,
- b) abgewandelte natürliche Produkte (Cellulose, Agar, Dextrene) und
- c) synthetische Polymere (z.B. Acrylate).

Die Auswahl dieser Trägermaterialien erfolgt je nach Verwendungszweck unter Berücksichtigung der materialspezifischen Vor- und Nachteile.

So sind beispielsweise die anorganischen Träger zwar sehr druckstabil, weshalb sie vor allem in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie eingesetzt werden, jedoch sind sie unbeständig gegenüber alkalischen Medien und nur eingeschränkt derivatisierbar, so daß Ihr Einsatz auf den laboranalytischen Bereich begrenzt ist. Infolge der im Vergleich zu synthetischen Polymeren geringen Beladungsdichte mit funktionalen Gruppen ist eine sehr kleine Teilchengröße ($5-10 \mu\text{m}$) erforderlich, um ausreichende Trennkapazitäten zu erzielen.

Die Polymerträger auf der Basis abgewandelter Naturprodukte finden heute vor allem im Laborbereich und teilweise im technischen Sektor die breiteste Anwendung. Bereits die ersten chromatographischen Prozeßaufreinigungen wurden mit Dextranmedien durchgeführt (Porath, Flodin, 1959), später wurden abgewandeltes Agar und Cellulose in entsprechend derivatisierter Form erfolgreich in die Chromatographie eingeführt. Vorteil dieser Materialien sind ihre hydrophilen Eigenschaften, während sich ihre mangelnde Druckstabilität und insbesondere ihre Anfälligkeit gegenüber Mikroorganismen als Hindernis für den technischen Einsatz herausgestellt hat.

Mit Medien auf rein synthetischer Basis versuchte man, die günstigen Eigenschaften der zuvor beschriebenen Trägermedien zu vereinen. Bis heute ist dies nicht völlig zufriedenstellend gelungen. Die meisten synthetischen Träger sind noch zu hydrophob und nicht ausreichend druckstabil, so daß sie insbesondere im Hinblick auf die Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie weiterer Verbesserungen bedürfen.

Eine den Trägermedien nach allen drei beschriebenen Arten gemeinsame Eigenschaft ist ihre zum Teil sehr ausgeprägte Porosität. Bisher war es die überwiegende Lehrmeinung und Auffassung von Herstellern von Chromatographiemedien, daß die Porosität und die damit einhergehende Vergrößerung der zugänglichen

Trägeroberfläche Grundvoraussetzung für gute Trennqualität sei.

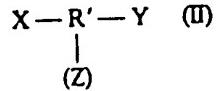
Auf der Grundlage dieses Standes der Technik lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Trägermaterialien, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und unter ihrer Verwendung bereitzustellen, die verbesserte Eigenschaften hinsichtlich ihrer Trennleistungen, Druckstabilität und Störanfälligkeit aufweisen.

Überraschend wurde nun gefunden, daß unporöse Medien, wie sie in der vorliegenden Anmeldung beschrieben werden, gegenüber den herkömmlichen Medien wesentlich bessere Auftrennleistungen aufweisen. Als unporös werden in diesem Sinne solche Medien bezeichnet, die eine Eindiffusion von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 6000 in das Innere des Polymeren nicht mehr ermöglichen. Für die technisch-industrielle Anwendung bedeutet dies, daß bei gleicher Trennleistung höhere Flußraten und bei gleicher Flußrate höhere Trennleistungen erzielbar sind und somit für entsprechende Anwendungszwecke ein wesentlich wirtschaftlicheres Arbeiten ermöglicht wird. Bei hohen Flußraten sind insbesondere die Trennqualitäten und Trennkapazitäten bei Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie deutlich besser als bei herkömmlichen Medien. Voraussetzung zur Erzielung dieser Trennleistungen sind hohe Beladungsdichten der Oberfläche mit kupplungsfähigen oder geladenen Gruppen.

Erfindungsgemäß werden Hydroxylgruppen tragende Polymere, wie z.B. Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyhydroxyethylacrylat oder Polyvinylalkohol, die in bestimmter Teilchengröße vorliegen und ein mittleres Molekulargewicht zwischen 15 000 und 300 000 aufweisen, in heterogener Phase mit bi- oder trifunktionellen Vernetzern umgesetzt. Das hydroxygruppenhaltige Polymer entspricht dabei der allgemeinen Formel I



wobei R einen hochmolekularen aliphatischen Kohlenwasserstoffrest bedeutet, der durch Sauerstoff und/oder Stickstoff substituiert sein kann oder sauerstoff- und/oder stickstoffhaltige Substituenten tragen kann, der bi- oder trifunktionelle Vernetzer entspricht der allgemeinen Formel II



wobei R – ein gegebenenfalls durch Sauerstoff substituierter aliphatischer Rest mit 1 bis 30 C-Atomen ist, und X, Y – sowie im Fall des trifunktionellen Vernetzers – Z entweder für Halogenatome und/oder Epoxygruppen stehen oder Isocyanatgruppen bedeuten. Vorgezogene werden als Vernetzer isocyanatgruppenhaltige Verbindungen, wie Hexamethylendiisocyanat, 3,5,5-Trimethyl-1-isocyanato-3-isocyanatomethylcyclohexan, 4,4'-Diisocyanatodicyclohexylmethan, oder Epoxyverbindungen wie Epichlorhydrin, Epibromhydrin, Dichlorhydrin, Dibromhydrin, Ethylenglykoldiglycidylether, Triethylenglykoldiglycidylether eingesetzt.

Der erforderliche Vernetzungsgrad und die gewünschten Porengrößen werden dadurch eingestellt, daß man die Vernetzungsreaktion in solchen Lösungsmitteln durchführt, die den Vernetzer gut, den Polymerträger jedoch kaum lösen oder quellen. Hier werden vorgezogene Dimethylformamid, Formamid, Acetamid,

Piperazin, Acetonitril sowie Aceton für die Umsetzung mit Isocyanaten einerseits sowie starke Basen wie Natronlauge oder Käflauge, vorzugsweise in 2 bis 6 normaler Konzentration oder tertiäre Amine, wie Trimethylamin oder Triethylamin für die Vernetzung mit Epoxiden andererseits eingesetzt. Eine genaue Einstellung des Quellungsgrades und damit der Porenweite des Gels ist dadurch möglich, daß man der organischen Phase Aceton oder niedermolekulare Alkohole wie Methanol oder Ethanol oder den Basen Dimethylformamid, Formamid, N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid oder Piperazin, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,5–20 Vol-% zusetzt.

Die Umsetzungen erfolgen vorzugsweise bei Temperaturen zwischen 40 und 60°C während 1 bis 3 Stunden. Isocyanate werden in Gegenwart metallorganischer Verbindungen, wie sie üblicherweise zur Polyurethanherstellung verwendet werden, wie Zinnoctoat, Butyl-zinn-(IV)-chlorid, Znn-(II)-chlorid, Zinn-oleat, Dibutyl-zinn-diethyl-maleat, oder Tetrabutyltitannat oder von zu dem gleichen Zweck gebräuchlichen Stickstoffbasen wie Triethylendiamin, Triethylentetramin, Dimethylbenzylamin durchgeführt. Die Konzentration der genannten Katalysatoren beträgt üblicherweise zwischen 0,05 und 1 Mol-%, bezogen auf das eingesetzte Isocyanat.

Durch Umsetzung der gewählten Polymeren in heterogener Phase werden im Vergleich zu nach herkömmlichen Verfahren erhaltenen Polymeren chemisch und biologisch sehr stabile vernetzte Grundpolymere erhalten. Durch die Wahl eines polymeren Ausgangsmaterials und dessen anschließende Derivatisierung nach Vernetzung wird gegenüber der Herstellung rein synthetischer Polymermaterialien eine weitaus größere Variationsbreite ermöglicht.

Die anschließenden Derivatisierungen können infolge der chemischen Stabilität des vernetzten Grundpolymeren unter Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, die im Vergleich zu herkömmlichen Medien sehr hohe Beladungsdichten mit funktionellen Gruppen ergeben. Die Porosität der Trägermaterialien kann schließlich in weiten Grenzen variiert werden, vorzugsweise bieten sie jedoch die Möglichkeit, die Porengröße so zu beschränken, daß Proteine mit einem Molekulargewicht über 6000 nicht in den polymeren Träger eindringen können.

Die mit der vorliegenden Erfindung erzielten Vorteile stehen im Gegensatz zu der bisher allgemein vertretenen Auffassung, eine ausreichende Porosität sei Voraussetzung für gute chromatographische Trennleistungen. Die Verwendung der erfundungsgemäßen synthetischen polymeren Trägermaterialien ermöglicht es erstmals, die Dichte der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägers über das bekannte Maß hinaus so zu steigern, daß eine genügend hohe Bindungskapazität für jede Art von Biomolekül gewährleistet ist. Bei herkömmlichen Trägern, wie Polysaccharidderivaten, Silikaten oder synthetischen Medien müssen die Biomoleküle zur Auftrennung zunächst in die Poren eindiffundieren, wo sie mit den funktionellen Gruppen in Wechselwirkung treten können. Dieser notwendige Diffusionsprozeß begrenzt die Durchfluß- bzw. Elutionsraten auf niedrige Werte. Bei der Verwendung der Trägermedien gemäß vorliegender Erfindung hingegen findet die Molekül-Träger-Interaktion vorwiegend bzw. ausschließlich auf der unmittelbar zugänglichen Polymeroberfläche statt, was zu einer wesentlichen Steigerung der Durchflußraten bei der Chromatographie vergli-

chen mit den bei herkömmlichen Verfahren erzielbaren führt. Dies ist insbesondere für einen wirtschaftlichen technischen Einsatz der Medien von großer Bedeutung.

Als Folge der besonders funktionellen Oberfläche der neuen Medien gestaltet sich darüber hinaus auch das Elutionsverhalten, insbesondere bei der Ionenaustauschchromatographie, gegenüber herkömmlichen Chromatographietechniken als vorteilhaft. Während für die Elution der verschiedenen Protein- bzw. Biomolekülfaktionen basische oder saure Gradienten mit hohen Salzkonzentrationen (bis zu 1-Molar) benötigt werden, bietet die Verwendung der erfundungsgemäßen Medien bereits bei Salzkonzentrationen unter 0,1 Mol/Liter ein ausgezeichnetes Elutionsverhalten. Dies ermöglicht durch den Wegfall der sonst notwendigen Entsalzung nicht nur einen ökonomischen und ökologischen Nutzen, es ermöglicht auch ein rasches und unproblematisches Weiterverarbeiten der verschiedenen Molekülfaktionen.

Die Vernetzung hydroxylgruppenhaltiger Träger kann zur Derivatisierung für Ionenaustauscher- oder andere Chromatographiemedien direkt ausgenutzt werden. Bei der Vernetzungsreaktion mit Isocyanaten oder Epoxiden wird vorzugsweise ein 1,5–4facher molarer Überschuß des Vernetzers, bezogen auf die Polymermenge, eingesetzt. Die Verwendung des Überschusses an Vernetzungsmittel führt dazu, daß sich nach der Vernetzungsreaktion ausreichend nicht umgesetzte Gruppen auf der Polymeroberfläche befinden, deren Konzentration überraschenderweise so hoch ist, daß eine weitere direkte Derivatisierung der Träger möglich wird.

Zur Darstellung von Affinitätsmedien können Liganden in Form von Peptiden, Proteinen, Zuckern oder Nucleotiden etc. direkt an die vorhandenen Epoxy- bzw. Isocyanatgruppen nach an sich bekannten Methoden gekoppelt werden. In analoger Weise können geladene Gruppen, wie sie für die unterschiedlichen Ionenaustauscher benötigt werden, in das Polymer eingeführt werden. Durch Reaktion der Epoxygruppen mit sekundären oder tertiären Aminen lassen sich stark oder schwach basische Medien herstellen.

In ähnlicher Weise können durch Reaktionen mit Sulfiten stark saure Gruppen erhalten werden. Die Derivatisierungsreaktionen werden vorzugsweise in wäßrigem Milieu oder in Lösungsmittelgemischen aus Wasser und Alkohol bei 40 bis 50°C während 3 bis 12 Stunden durchgeführt. Das Derivatisierungsagens wird allgemein dabei in einem 2 bis 10fachen Überschuß, bezogen auf die Molmengen der vorhandenen Epoxygruppen eingesetzt.

Besondere Bedeutung wird der Geometrie von Trägermedien zugemessen. Die allgemein in der Literatur vertretene Meinung ist, daß eine ideal-kugelförmige Ausbildung der Medien Voraussetzung für gute Trenneigenschaften sei. Daher werden kommerziell erhältliche Träger für den rein analytischen Bereich auch fast ausschließlich in Kugel- bzw. Perlform angeboten. In den letzten Jahren ist man sogar dazu übergegangen, für die "high performance liquid chromatography" (HPLC) im Milliliter-Maßstab "monosized beads", d.h. Träger mit einer völlig einheitlichen Partikelgröße von 5–20 µm anzubieten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nun überraschend gefunden, daß die Trennqualität nicht in dem bisher angenommenen Maße von der Geometrie des Trägermaterials abhängt, sondern bei gegebener Teilchengröße vor allem von der Oberflächenbeschaf-

fenheit sowie der vorhandenen Beladungsdichte mit funktionellen Gruppen.

Die vorliegend beschriebenen Trennmedien können aufgrund ihrer hohen Oberflächenkapazität in unregelmäßiger Granulatform als "fast-flow"-Medien im analytischen Bereich eingesetzt werden.

Vergleichbare Trennleistungen, wie sie nur mit "monosized microbeads" (5–10 µm) erzielt werden, können mit den erfundungsgemäßen Trägern mit einer um den Faktor 5–10 höheren Teilchengröße erreicht werden. Dies bietet einerseits den Vorteil, daß zum Erreichen hoher Durchflußgeschwindigkeiten nur ein minimaler Druck aufgewendet werden muß, zum anderen ergeben sich derartige Verbesserungen des Herstellungsverfahrens, daß die Medien wirtschaftlich auch für den technischen Bereich eingesetzt werden können. Bei den bisher handelsüblichen "monosized beads" ist dies wegen der damit verbundenen Kosten ausgeschlossen.

Im folgenden werden auch Herstellungsverfahren speziell für die technische Anwendung beschrieben, bei der Säulenfüllungen im kg-Maßstab eingesetzt werden, die teilweise erhebliche Kompressionsdrücke zur Folge haben.

Hierzu werden Polymere mit funktionellen oder kupplungsfähigen Seitengruppen entweder durch Plasmapolymerisation oder durch Beschichtung aus Lösung auf kugelförmige Matrices aufgebracht.

Als Substrat für beide Verfahrenswege können grundsätzlich alle in Kugel- bzw. in Perlform vorliegenden Materialien, wie Glas, Kunststoff, Keramik, Silikate oder metallische Werkstoffe verwendet werden. Besonders geeignet sind solche Substrate, die sich durch mechanische Stabilität auszeichnen.

Die Beschichtung mittels eines Plasmas ist grundsätzlich in Anlagen möglich, die Gase zu ionisieren in der Lage sind. Im allgemeinen werden hierzu Hochfrequenzgeneratoren verwendet, die bei einer Leistung von 100 bis 600 Watt im KHz-, MHz- oder GHz-Bereich arbeiten. Anstelle von Lösungsverfahren werden hierbei Gase als Reaktionspartner eingesetzt.

In einer als Prozeßkammer dienenden Vakuumkammer (Fassungsvermögen 1 l) werden Monomere oder Monomergemische bei Drucken von vorzugsweise 0,5–2 mbar eingespeist, die nach der induktiven Zündung mit der Substratoberfläche reagieren. Dabei wird ein zusammenhängender Polymerfilm auf der Matrix gebildet, der je nach Konzentration der Monomeren sowie der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 0,1 und 2 µm dick ist. Nach diesem Verfahren kann vorteilhaft eine Beschichtung unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, wobei durch Variation der Prozeßparameter wie Verweilzeit, Gasdruck, Gaszusammensetzung eine breite Palette von Oberflächenmodifizierungen möglich ist.

Grundsätzlich sind Plasmen im KHz- und MHz-Bereich möglich. Es wurde jedoch festgestellt, daß mit zunehmender Frequenz der Wirkungsgrad der Gasentladung stark ansteigt. Aus diesem Grund wird aus Gründen der Praktikabilität mit Mikrowellen (245 GHz) angeregt, da auch die Abscheidungsraten um den Faktor 100 höher liegen als bei Niederfrequenzen.

Um eine gleichmäßige Ausbildung der Beschichtung zu erhalten, wird die zu beschichtende Probe vorzugsweise im Plasma mit 40–100 Umdrehungen pro Minute gedreht.

Für die Beschichtung mittels eines Plasmas eignen sich alle verdampfbaren Monomeren mit entsprechenden funktionellen Seitengruppen wie Glycidylmethacry-

lat, Glycidylacrylat, Allylglycidylether, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat oder Vinylacetat. Die anschließende Derivatisierung zu Ionenaustauschern oder Affinitätsmedien geschieht, wie zuvor bei den Polymergranulaten beschrieben, über die Epoxygruppe, entweder durch zuvorige Umsetzung mit einer Epoxy-Verbindung der allgemeinen Formel II oder durch direkte Umsetzung der epoxyhaltigen Polymerschicht mit Aminen oder Sulfiten.

10 Die Beschichtung mittels Plasmapolymerisation bietet sich insbesondere für kleine Chargen mit geringen Teilchengrößen (unter 100 µm) an.

Für die Beschichtung aus Lösung eignen sich insbesondere solche Polymere, die in bestimmten Lösungsmitteln nur in der Hitze löslich sind wie Polyvinylalkohol Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, wobei als Lösungsmittel beispielsweise Dimethylformamid, Ethylenglykol oder Glycerin verwendet werden können.

20 Als Matrix dienen die bei der Plasmabeschichtung beschriebenen kugelförmigen Substrate.

Im ersten Verfahrensschritt werden die hydroxygruppenhaltigen Polymeren in einem der Lösungsmittel in der Hitze, vorzugsweise bei 85–110°C, gelöst. Die perlöhrige Matrix, die zuvor auf –10°C abgekühlt wurde, wird nun mit der heißen Polymerlösung in Kontakt gebracht und anschließend rasch abgesaugt. Hierbei schlägt sich das Polymere auf der Oberfläche der Matrix nieder und bildet so einen zusammenhängenden Film, dessen Schichtdicke von der Konzentration der Polymerlösung, der Kontaktzeit sowie der Temperatur des Substrates abhängt. Die Konzentration der Polymerlösung beträgt vorzugsweise 1–10 Gew.-%. Nach dem Trocknen der beschichteten Medien erfolgt mittels der zuvor beschriebenen Epoxy- oder Isocyanatverbindungen die Vernetzung sowie die Derivatisierung.

Die Beschichtung aus Lösung ist vor allem für solche Medien geeignet, die für den technischen Einsatz in Frage kommen.

25 40 Die Erfahrung wird anhand der nachfolgenden Beispiele veranschaulicht:

Beispiel 1

45 10 Teile Hydroxyethylacrylat-Granulat mit einer mittleren Teilchengröße von 100 µm und einem mittleren Molgewicht von 55 000 werden in 80 Teilen wasserfreiem Dimethylformamid suspendiert. Dieser Mischung werden 8 Teile Hexamethylendiisocyanat und 50 0,1 Teile Zinn-octoat zugefügt. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 45°C unter starkem Rühren (800 U/min) umgesetzt. Nach der Reaktion wird abgesaugt und mit Aceton 5mal gewaschen. Das Produkt wird anschließend im Vakuum getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

Beispiel 2

50 Teile Polyvinylalkohol-Granulat mit einer mittleren Teilchengröße von 150 µm und einem mittleren Molgewicht von 127 000 werden in einer Lösung aus 150 Teilen Wasser und 15 Teilen Natriumhydroxyd unter starkem Rühren (900 U/min) suspendiert, anschließend werden 130 Teile Epichlorhydrin zugefügt. Die Umsetzung erfolgt bei 58°C für 2 Stunden, anschließend wird abgesaugt und 10mal mit 300 Teilen Wasser gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet und im Kühlschrank bei –15°C aufbewahrt.

Beispiel 3

30 Teile des vernetzten Polyvinylalkohol-Granulats gemäß Beispiel 2 werden mit 70 Teilen 3n-Salzsäure versetzt und bei 30°C 24 Stunden gerührt. Anschließend wird abgesaugt und 5mal mit je 300 ml Wasser nachgewaschen. Das Produkt wird in Wasser aufbewahrt; es ist so für ein Gelfiltrationsexperiment direkt gebrauchsfertig.

Beispiel 4

10 Teile des Polyhydroxyethylacrylats gemäß Beispiel 1 werden mit einer Lösung aus 32 Teilen Dimethylformamid und 1,2 Teilen Maltose 24 Stunden bei 45°C im Wasserbad unter Schütteln umgesetzt. Anschließend wird abgesaugt und 6mal mit 200 Teilen Wasser gewaschen. Das so erhaltene Kupplungsprodukt wird in einem 0,1-molaren Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,0 aufbewahrt und ist so für eine affinitätschromatographische Auftrennung gebrauchsfertig.

Beispiel 5

20 Teile Polyvinylalkohol gemäß Beispiel 2 werden mit einer Lösung aus 37 Teilen Trimethylamin, 15 Teilen Methanol und 10 Teilen Wasser versetzt und 12 Stunden bei 35°C umgesetzt. Das Produkt wird abgesaugt und 10mal mit 200 Teilen Wasser gewaschen. Anschließend wird mit 200 ml 0,5 n-Natriumhydroxydösung, 500 ml Wasser, 300 ml 1n-Salzsäure und 500 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wird in Wasser aufbewahrt und ist als stark basischer Ionenaustauscher direkt gebrauchsfertig.

Beispiel 6

In einer Plasmaanlage mit einem 2,45 GHz-Hochfrequenzgenerator und einer Leistung von 600 Watt werden 2 Teile perlöfrmiges Polystyrol mit einer mittleren Teilchengröße von 70 µm mit einem Plasma aus Glycidymethacrylat und N-Vinylpyrrolidon 25 Minuten behandelt. Glycidymethacrylat und N-Vinylpyrrolidon werden bei einem Gasdruck von 0,9 und 0,2 mbar mittels eines Dosiventils eingespeist. Nach dem Versuch wird das Produkt 30 Minuten im Hochvakuum evakuiert und bei -15°C unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt.

Beispiel 7

30 Teile perlöfrmiges Polystyrol mit einer mittleren Teilchengröße von 80 µm werden auf -10°C abgekühlt. Sodann wird das Polymermaterial in eine 90°C heiße Lösung aus 125 Teilen Glycerin und 7,5 Teilen Polyvinylalkohol eines mittleren Molgewichts von 127 000 eingebracht und sofort danach abgesaugt. Anschließend wird mit 300 ml Methanol und 300 ml Aceton nachgewaschen und das Material an der Luft getrocknet. Es wird ein perlörmiger Träger mit einem festhaftenden Polymerüberzug gewonnen. Das Produkt wird mit 125 Teilen Epichlorhydrin und einer Lösung aus 150 Teilen Wasser und 18 Teilen Natriumhydroxyd versetzt. Die Mischung wird 2 Stunden bei 55°C unter starkem Rühren zur Reaktion gebracht. Das Produkt wird anschließend abgesaugt und mit 2 Litern Wasser portionsweise gewaschen. Trocknung und Aufbewahrung geschieht entsprechend Beispiel 6.

20 Teile des nach Beispiel 7 hergestellten Polymerträgers werden mit einer Lösung aus 150 Teilen Wasser, 15 Teilen Natriumsulfit und 10 Teilen Natriumhydrogen-sulfit versetzt und 20 Stunden bei 50°C im Wasserbad unter Schütteln umgesetzt. Das Material wird abgesaugt und mit 1,5 Litern Wasser portionsweise nachgewaschen. Das erhaltene Produkt wird in Wasser aufbewahrt und ist als stark saurer Ionenaustauscher direkt gebrauchsfertig.

Beispiel 8

20 Teile Polyvinylalkohol gemäß Beispiel 3 werden in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1 cm) eingefüllt und anschließend mit Wasser equilibriert. Eine wäßrige Lösung aus 50 µg Ovalbumin, 45 µg Ribonuclease, 800 µg Natriumcitrat und 900 µg Ammoniumhydrogencybonat wird auf die Säule aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mit Wasser eluiert. Es wird eine vollständige Trennung der Protein- und Salzfraktionen erhalten.

Beispiel 9

10 Teile mit Trimethylamin derivatisierten Polyvinylalkohols gemäß Beispiel 5 werden in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1 cm) gefüllt und mit 2,5 mM Tris-Puffer, pH 8,0, 20 Minuten equilibriert. 300 µl Humanserum (33% verdünnt) werden auf die Säule aufgetragen. Nach 5 Minuten wird mit einem 0,5 molaren Natriumacetat-Gradienten eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 2,4 ml/min. Es resultiert eine Auftrennung mit mindestens 10 verschiedenen Proteinfraktionen, deren Chromatogramm in Fig. 1 dargestellt ist.

Beispiel 10

40 10 Teile des mit Maltose gekoppelten Affinitätsträgers gemäß Beispiel 5 werden in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1 cm) gefüllt und mit 0,01 molaren Natriumcitrat-Puffer, pH 6,0, equilibriert. Anschließend werden 10 ml 0,01 M Natriumcitrat-Puffer, in dem 50 mg α -Amylase und 50 mg Ribonuclease gelöst sind, auf die Säule aufgetragen. Es wird mit 20 ml/Stunde eluiert. Die Ribonuclease-Fraktion läuft dabei vollständig durch die Säule, während die α -Amylase quantitativ auf dem Affinitätsträger zurückgehalten wird. Die vollständige Elution der α -Amylase geschieht durch Anlegen eines 0,25 molaren Natriumcitrat-Gradienten.

Beispiel 11

55 10 Teile des mit Maltose gekoppelten Affinitätsträgers gemäß Beispiel 5 werden in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1 cm) gefüllt und mit 0,01 molaren Natriumcitrat-Puffer, pH 6,0, equilibriert. Anschließend werden 10 ml 0,01 M Natriumcitrat-Puffer, in dem 50 mg α -Amylase und 50 mg Ribonuclease gelöst sind, auf die Säule aufgetragen. Es wird mit 20 ml/Stunde eluiert. Die Ribonuclease-Fraktion läuft dabei vollständig durch die Säule, während die α -Amylase quantitativ auf dem Affinitätsträger zurückgehalten wird. Die vollständige Elution der α -Amylase geschieht durch Anlegen eines 0,25 molaren Natriumcitrat-Gradienten.

Patentansprüche

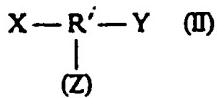
1. Synthetisches polymeres Trägermaterial für chromatographische Trennverfahren, erhältlich durch

a) Umsetzung eines OH-Gruppen enthaltenden Polymeren eines mittleren Molekulargewichts zwischen 15 000 und 300 000 der Formel I,

R-OH (I)

wobei R einen hochmolekularen aliphatischen Kohlenwasserstoffrest bedeutet, der durch Sauerstoff und/oder Stickstoff substituiert sein oder sauerstoff- und/oder stickstoffhaltige

Substituenten tragen kann,
mit einem bi- oder trifunktionellen Vernetzer
der allgemeinen Formel II



5

wobei R' ein ggfs. durch Sauerstoff substituierter aliphatischer Rest mit 1 bis 30 C-Atomen ist, und X, Y — sowie im Fall eines trifunktionellen Vernetzers — Z entweder für Halogenatome und/oder Epoxygruppen stehen oder Isocyanatgruppen bedeuten,
in heterogener Phase in einem Lösungsmittel, das den Vernetzer gut, den Polymerträger jedoch kaum löst oder quellt, und Derivatisierung des erhaltenen Produkts zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen, oder
b) Plasmabeschichtung eines kugel- oder perlörmigen, mechanisch stabilen Matrixkörpers mit mindestens einem eine oder mehrere Epoxy-, Isocyanat-, Hydroxygruppen oder zu Hydroxygruppen verseifbare Gruppen tragenden, verdampfbaren monomeren Grundkörper und Derivatisierung des erhaltenen Produkts zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen.

15

20

25

30

35

2. Trägermaterial nach Anspruch 1, wobei bei der Herstellung nach a) die Vernetzung in Gegenwart einer in dem Lösungsmittel gut löslichen Base, vorzugsweise einem Alkali- oder Erdalkalihydroxid oder einem aliphatischen Amin durchgeführt wird.

3. Trägermaterial nach Anspruch 1, wobei bei der Herstellung nach a) die Umsetzung mit einem Isocyanatgruppen enthaltenden Vernetzer in Gegenwart eines Katalysators durchgeführt wird, der in dem Lösungsmittel gut löslich ist und der entweder eine der üblicherweise zur Polyurethanherstellung verwendeten metallorganischen Verbindungen, vorzugsweise der Metalle Zinn oder Titan, oder eine der zu dem gleichen Zweck üblicherweise verwendeten Stickstoffbasen sein kann.

40

4. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1–3, wobei bei der Herstellung nach a) als Lösungsmittel Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid, Formamid, Piperazin, Wasser allein oder als Mischung verwendet werden können.

45

5. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Herstellung nach a) die Porenweite so eingestellt wird, daß Proteine mit einem Molekulargewicht über 6000 nicht in den polymeren Träger eindringen können.

55

6. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Herstellung nach a) Porenweite und Quellungsgrad des Gels durch Zugabe von Aceton oder niedermolekularen Alkoholen zur organischen Phase oder von Dimethylformamid, Formamid, N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid, Piperazin zu den Basen, vorzugsweise in einer Menge zwischen 0,5 und 20 Vol-% eingestellt werden.

60

7. Trägermaterial nach Anspruch 1, wobei bei der Herstellung nach b) als kugel- oder perlörmige Matrix ein aus Kunststoff, Glas, Keramik, Silikat

oder Metall bestehendes Material verwendet wird.
8. Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 7, wobei bei der Herstellung nach b) ein Prozeßgas, insbesondere Sauerstoff, Stickstoff, ein Edelgas, Luft oder Fluorkohlenwasserstoffe in reiner Form oder im Gemisch miteinander verwendet wird.

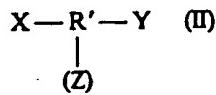
9. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1–6, wobei bei der Herstellung nach a) die Derivatisierung direkt durch Umsetzung mit einem Überschuß an Vernetzungsmittel, insbesondere dem 1,5- bis 4fachen Überschuß durchgeführt wird.

10. Trägermaterial nach einem der Ansprüche 1–6, wobei die Beschichtung eines kugel- oder perlörmigen Substrats mittels eines gemäß Anspruch 1a) herstellbaren Polymeren aus einer Lösung des Polymeren in einem Lösungsmittel erfolgt.

11. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen polymeren Trägermaterials für chromatographische Trennverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß OH-Gruppen enthaltende Polymere eines mittleren Molekulargewichts zwischen 15 000 und 300 000 der Formel I



wobei R einen hochmolekularen aliphatischen Kohlenwasserstoffrest bedeutet, der durch Sauerstoff und/oder Stickstoff substituiert sein oder sauerstoff- und/oder stickstoffhaltige Substituenten tragen kann,
mit einem bi- oder trifunktionellen Vernetzer der allgemeinen Formel II



wobei R' ein ggfs. durch Sauerstoff substituierter aliphatischer Rest mit 1 bis 30 C-Atomen ist, und X, Y — sowie im Fall eines trifunktionellen Vernetzers — Z entweder für Halogenatome und/oder Epoxygruppen stehen oder Isocyanatgruppen bedeuten,

in heterogener Phase in einem Lösungsmittel, das den Vernetzer gut, den Polymerträger jedoch kaum löst oder quellt, umgesetzt werden und daß das erhaltene Produkt zu Affinitätsmedien oder Ionenaustauschergruppen derivatisiert wird.

12. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen polymeren Trägermaterials für chromatographische Trennverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß ein kugel- oder perlörmiger, mechanisch stabiler Matrixkörper mit mindestens einem eine oder mehrere Epoxy-, Isocyanat-, Hydroxygruppen oder zu Hydroxygruppen verseifbare Gruppen tragenden, verdampfbaren monomeren Grundkörper ggfs. in Anwesenheit eines Prozeßgases plasmabeschichtet wird.

13. Verwendung des Trägermaterials nach einem der Ansprüche 1–11 oder des Verfahrensproduktes gemäß Ansprüchen 12 und 13 zur Herstellung von Ionenaustauschern oder zu einem für die Reversed-Phase-Chromatographie geeigneten Träger.